

令和元年6月13日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07456

研究課題名(和文) グアニン4重鎖(G4)とG4結合タンパク質Rif1による染色体制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of chromatin architecture by G-quadruplex and its binding protein, Rif1

研究代表者

深津 理乃 (FUKATSU, Rino)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：70600419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進化的に保存された核因子Rif1は、G4を認識・結合し、核膜近傍にクロマチンに複製開始に抑制的なクロマチンドメインを形成する。G4はHEATリピート構造を有するN端、及び構造不明のC端に独立のG4結合ドメインを有する。また、8-16量体を形成する。Rif1は、パラレル型の多量体のG4に選択的に結合し、同時に複数のG4に結合する。複製抑制能を消失した2種類の点変異体L848S, R236Hを同定した。L848Sは染色体結合能を喪失しているが、R236Hは結合できる。これらの結果に基づき、Rif1はビーズのような多量体を形成し多数のG4を束ねて、クロマチンループを形成するというモデルを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内クロマチン構造は、複製、転写、組換え、修復等染色体の維持や機能発現と密接に関連する。TAD (Topologically Associated Domain)は、発生、分化の過程での転写制御や、DNA複製の時空間制御に関連することが明らかとなっている。我々はRif1という核因子がこの過程の制御に重要な役割を果たすことを見出した。本研究により、Rif1による染色体高次構造形成における、G4の重要性、及び、関与するRif1上の機能ドメインが明らかとなった。本研究成果は、これまで未知であったG4の生物学的意義の一端を解明するとともに、G4-Rif1を用いた染色体高次構造の人為的操作の可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：A conserved nuclear factor, Rif1, is required for genome-wide regulation of origin firing timing. It represses origin firing through its ability to generate replication-repressive chromatin architecture and to recruit a phosphatase. It binds to G-quadruplex through its two G4 binding domain, one located in the N-terminal HEAT repeats and the other located near the C-terminus. It binds preferentially parallel-type, oligomerized G4. Both N-terminal HEAT repeats and the C-terminal unknown domain are required for origin suppression by Rif1. Genetic screening for a mutant that can bypass Cdc7(Hsk1) function led to identification of L848S and R236H that can no longer repress replication. L848S fails to bind to chromatin, but R236H still binds to chromatin. On the basis of the results, we have proposed a model on how multimeric Rif1 protein binds to multimeric G4 on the chromatin and tether chromatin fibers to generate a higher-order chromatin structure.

研究分野：分子生物学

キーワード：グアニン4重鎖 Rif1 複製タイミング 染色体高次構造 多量体化 DNA結合 HEATリピート DNA複製

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表者らの研究グループは、分裂酵母の遺伝学的探索から、酵母からヒトまで保存される核因子Rif1がゲノムワイドの複製タイミングドメインを規定することを発見した(Hayano et al. Genes Dev 2012; Yamazaki et al. EMBO J 2012)。分裂酵母のRif1欠損株ではゲノムワイドの複製タイミングが大きく変動する。特に、telomereなど後期複製領域が初期に複製開始するように変化する。Rif1は、G1初期に染色体にpre-RC(複製前複合体)の形成とは独立に、ゲノム上の核骨格に類似した不溶性の領域に特異的に結合する。動物細胞では、Rif1の発現レベルに応じてクロマチンループサイズが変化することから、このクロマチンループが複製タイミングドメインと関連すると考えられている(図1)。

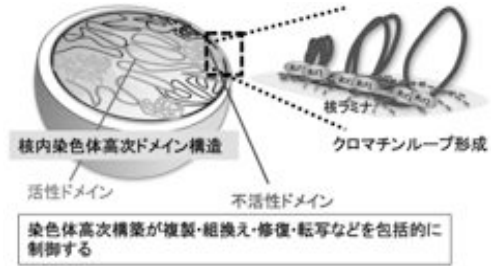


図1 Rif1は核骨格領域あるいは核小体辺縁部に局在し、クロマチンループ構造を形成することにより核内染色体ドメインの形成と空間的配置を決定し、これにより複製タイミングや転写・組換え・修復などを統合的に制御する。



図2 分裂酵母ゲノム上のRif1結合領域(Rif1BS)に保存されて存在する配列(Rif1CS)。

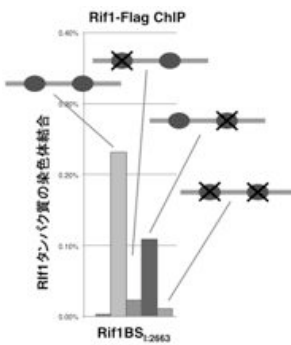


図3 RifBSに存在する2個の保存配列(Rif1CS)の点変異によりRif1のクロマチン結合が消失する。

した(Kanoh, Matsumoto, Fukatsu et al. Nature Struc. Mol. Biol. 2015)。

- (1) Rif1BSは、遺伝子間に存在し、preRCとは一致しない。
- (2) Rif1BSは、late/dormant複製起点の近傍に存在する。
- (3) Rif1BS内にGに富む保存された配列(Rif1CS)が同定された(図2)
- (4) Rif1CSは、head-to-tailでタンデムに現れることが多い。
- (5) Rif1CS配列に点変異を導入すると、染色体への結合が消失し、その近傍100kbに渡って複製開始が脱制御される(図3)。
- (6) Rif1BS配列はRif1CSに依存して、G4構造をin vitroで形成する。
- (7) Rif1タンパク質はin vitroでG4構造を特異的に認識し結合する。

以上の発見は、Rif1はゲノム上の遺伝子間領域に形成されるG4構造に結合し、複製開始に抑制的な染色体ドメインを形成する可能性を指摘する。そこで、Rif1とG4構造の相互作用を詳細に生化学的に解析し、この相互作用がクロマチンドメインをどのように制御するかを解明しようとして、本提案をするに至った。

2. 研究の目的

グアニン4重鎖(G4)構造は代表的な非B型DNA構造でありヒトゲノム上に35万カ所以上も存在すると推定されているが、実際それがゲノム上にどのように分布し、どのような生物学的な意義を有するかは未知であった。最近代表者らは複製タイミングを制御する進化的に保存された因子Rif1は、遺伝子間に存在するG4構造を認識・結合し染色体ドメイン構造を制御することにより複製タイミングを規定することを見出した。そこで本研究では、Rif1とG4構造の相互作用を生化学的に詳細に解析するとともに、Rif1とG4相互作用が染色体高次構造を制御するメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

- (1) Rif1の種々の欠失誘導体を作製し、その細胞内での機能を測定する。
- (2) 複製活性抑制能を喪失したRif1の変異体を遺伝的にスクリーニングする。
- (3) 上記のRif1変異体の生化学的性状、機能を解析する。
- (4) Rif1全長および誘導体の形態を電子顕微鏡で解析する。
- (5) 細胞内でRif1結合部位にG4構造が形成されることを示すとともに、その形成に必要なとされる因子を探索する。

4. 研究成果

Rif1はパラレル型の多量体型のG4の高い親和性で結合する

精製したRif1は、パラレル型のG4に高い親和性(Kd=0.3 nM)で結合するがアンチパラレル型には結合しない。また、多量体を形成するG4により高い親和性で結合する。

Rif1は2個のG4結合ドメインを持ち、多量体を形成する(図4)

Rif1の一次構造的には、Rif1のN末端領域のアミノ酸配列が比較的保存されており、ヘリカル反復配列HEATリピートが存在する。HEATリピートは、染色体凝縮や姉妹染色分体接着を担うコンデンシンやコヒーシンのサブユニットにも見られ、染色体の高次構造制御における共通の

機能が示唆される。ゲルろ過アッセイ、グリセロール濃度勾配遠心などにより、分裂酵母 Rif1 は 4-16 個のサブユニットが集合した多量体を形成する。

Rif1 は、N 末端 HEAT リピード構造及び C 端に 2 個の G4 結合ドメインを有することを見出した。C 端 G4 結合ドメインは、HEAT リピードドメインより G4 に対する特異性が高い。N 端、C 端のみでは G4 に対する親和性は全長より低く、両者の存在下で G4 に高親和性で結合できる。また、C 端 91aa のみで多量体(8 量体あるいは 16 量体)を形成することが明らかとなった(図 5)。

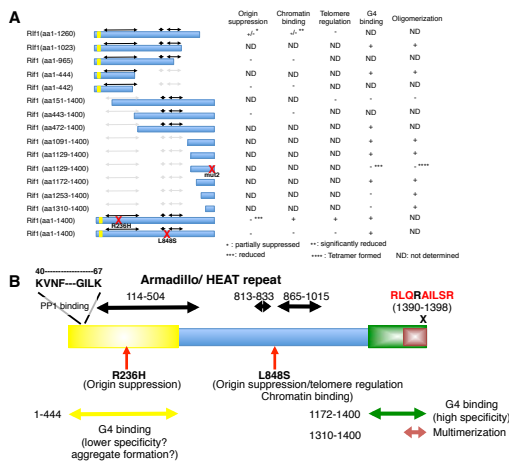


図 4 Rif1 タンパク質の機能解析 作製された欠失及び点変異体。それぞれの変異体の細胞内及び生化学的機能を解析した。Mut2 は B に示された C 末端に存在する保存されるアミノ酸モチーフの変異体である。

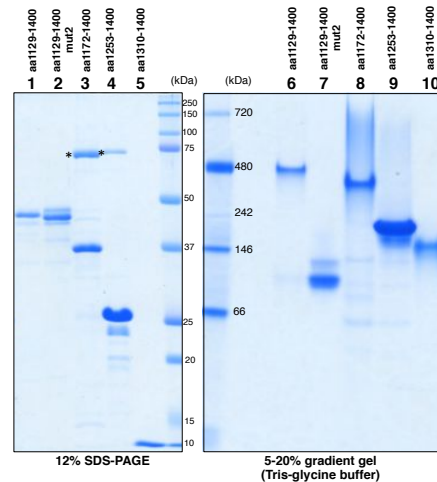


図 5 Rif1C 端ポリペプチドの多量体解析 精製した C 端ポリペプチドを変性ゲル(左)及び未変性ゲル(右)で泳動した。C 端 91aa(レーン 5,10)は 10kDa くらいのポリペプチドであるが、160kDa くらいの位置に泳動する。Mut2 変異により 1129-1400 の多量体形成が部分的に消失する。

複製開始抑制に必要な構造

欠失誘導体の解析から、N 末端 HEAT リピード構造及び C 端領域のいずれも Rif1 の複製起点抑制活性に必要とされることがわかった。また、hsk1(複製開始に必須な Cdc7 キナーゼの分裂酵母ホモログ)変異をバイパスする能力を指標に 2 種類の点変異体(複製起点活性化抑制能の変異)を同定した。L848S 変異は ChIP アッセイにより染色体 Rif1BS(結合部位)への結合能が減弱していたが、R236H 変異は Rif1BS への結合は正常であった。従って、クロマチン結合のみでは、複製活性を抑制できないことが明らかである。また、L848S 変異がクロマチン結合できないことから、細胞内での Rif1 クロマチン結合には、C 端 G4 結合能のみでは十分でないことがわかる(図 4)。

Rif1 によるクロマチンループ形成のモデル

プルダウンアッセイにより、Rif1 は *in vitro* で複数個の G4 構造と同時に結合できることを示した。さらに、これらの結果から、Rif1 が、染色体上の複数の G4 と相互作用し、クロマチン繊維を束ねてクロマチンループを形成するというモデルを提唱した(図 6, 7)。

まとめ

Rif1 の分子解剖から、分子上に 2 個の G4 結合ドメインを同定した。また C 端 91aa は、G4 結合能はないが、そのみで 16 量体を形成する(図 8)。これらのドメインは、いずれも Rif1 の複製開始抑制能に必須である。

Electron microscopic Analyses of mouse Rif1 (N+C)

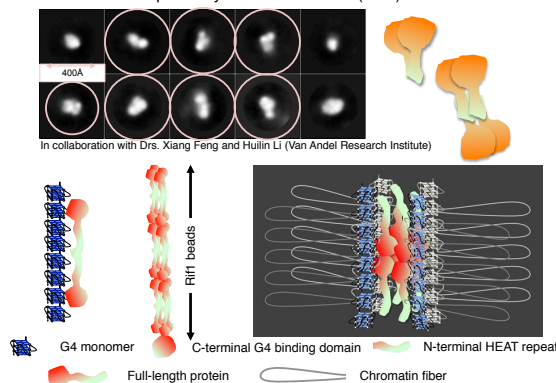


図 6 Rif1 による多量体化と G4 との相互作用によるクロマチンループ形成モデル(発表論文 2 の表紙に採用)

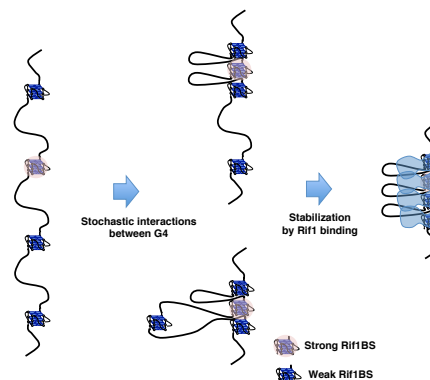


図 7 クロマチン上の G4 と Rif1 の相互作用によるクロマチンループ形成のモデル(発表論文 1 による)

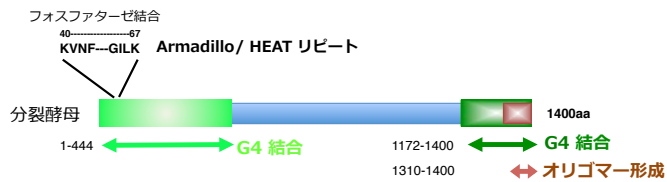


図8 Rif1 タンパク質の機能ドメイン N 端の Armadillo/ HEAT リピート構造はすべての生物種の Rif1 に保存される。C 端近傍の配列は保存されないが、G4 結合ドメインと多量体形成能を有する。N 端領域も G4 結合能を有する。N 端と C 端の両者の存在下で、より高い親和性で G4 に結合する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) 「Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities」

*Masai H, Fukatsu R, Kakusho K, Kanoh Y, Moriyama K, Ma Y, Iida K, Nagasawa K

Scientific Reports in press

(2) 「Both a unique motif at the C terminus and N-terminal HEAT repeat contribute to G4 binding and origin regulation by Rif1 protein.」

Kobayashi S*, Fukatsu R*, Kanoh Y*, Kakusho N, Matsumoto S, Chaen S, Masai H

Molecular and cellular biology 39(4) 2018 年 査読有り

DOI 10.1128/MCB.00364-18 (*Featured in the cover figure*)

***These three equally contributed to this work.**

(3) 「Molecular architecture of G-quadruplex structures generated on duplex Rif1 binding sequences.」

Masai H, Kakusho N, Fukatsu R, Ma Y, Iida K, Kanoh Y, Nagasawa K

The Journal of biological chemistry 293(44) 17033-17049 2018 年 査読有り

DOI 10.1128/MCB.00364-18

(4) 「Checkpoint-Independent Regulation of Origin Firing by Mrc1 through Interaction with Hsk1 Kinase.」

Matsumoto S, Kanoh Y, Shimmoto M, Hayano M, Ueda K, Fukatsu R, Kakusho N, Masai H.

Molecular and cellular biology 37(7) 2017 年 [査読有り]

DOI 10.1128/MCB.00355-16.

(5) 「Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells.」

Yang CC, Suzuki M, Yamakawa S, Uno S, Ishii A, Yamazaki S, Fukatsu R, Fujisawa R, Sakimura K, Tsurimoto T, Masai H.

Nature communications 7 12135 2016 年 [査読有り]

DOI 10.1038/ncomms12135.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 第 41 回日本分子生物学会年会(2018 年)

「DNA-RNA hybrid and G-quadruplex: exploring their biological significance as new genome signatures.」

正井 久雄、加納 豊、覺正 直子、深津 理乃、田中 卓、吉沢 直子、森山 賢治、小林 駿介、鷺 朋子、関口 直樹、松本 清治、加藤 宏幸

(2) 第 41 回日本分子生物学会年会(2018 年)

「Rif1 の結合標的であるグアニン 4 重鎖構造の細胞内存在と形成のメカニズム」加納 豊 1, 松本 清治 1, 関口 直樹 1,3, 小林 俊介 2,1, 深津 理乃 1, 覺正 直子 1, 正井 久雄 1(1 都医学研・ゲノム医科学, 2 日大・相関理 化学・総基礎科学, 3 東京バイオ専門学校)

(3) 第 41 回日本分子生物学会年会(2018 年)

「グアニン 4 重鎖結合タンパク質 Rif1 の構造・機能解析」

小林 駿介 1,2, 深津 理乃 1, 加納 豊 1, 覺正 直子 1, 松本 清治 1, 正井 久雄 1(1 公益財団法人 東京都医学総合研究所・ゲノム動態プロジェクト, 2 日大・院総合基礎科学研究科・相関理化学専攻)

(4) 3R&3C Symposium(国際学会)(2018 年)

「Rif1 promotes self-association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities.」

Hisao Masai, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Yutaka Kanoh, Kenji Moriyama, Yue Ma, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa.

(5) 3R&3C Symposium(国際学会)(2018 年)

「Analysis of function and structure of G4 binding domain of fission yeast Rif1 protein.」

Shunsuke Kobayashi, Rino Fukatsu, Yutaka Kanoh, Naoko Kakusho, Seiji Matsumoto, Hisao Masai.

(6) 第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年)

「Rif1 が結合するグアニン 4 重鎖構造の細胞内存在と形成のメカニズムの解明」

加納 豊 1、松本 清治 1、深津 理乃 1、覚正 直子 1、正井 久雄 1 (1.東京都医学研・ゲノム医科学)

(7) 第 40 回日本分子生物学会年会(招待講演)(2017 年)

「グアニン 4 重鎖構造:諸刃の剣のゲノム情報」

正井 久雄 1、加納 豊 1、田中 卓 1、深津 理乃 1、森山 賢治 1、小林 駿介 1、覚正 直子 1、伊藤 さゆり 1、鷲 朋子 1、馬 悦 2、長澤 和夫 2、松本 清治 1、新本 美智枝 1、吉沢 直子 1 (1.東京都医学研・ゲノム医科学、2.東京農工大学・大学院工学研究院)

(8) 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ(2017 年)

「グアニン 4 重鎖結合タンパク質 Rif1 の構造・機能解析」

小林 駿介、深津 理乃、加納 豊、正井 久雄

(9) The 10th International 3R Symposium(国際学会)(2016 年)

「Rif1 interacts with chromatin through G-quadruplex and regulates DNA replication」

加納 豊、松本 清治、深津 理乃、覚正 直子、長澤 和夫、正井 久雄

(10) The 10th International 3R Symposium(国際学会)(2016 年)

「G4 binding domain of fission yeast Rif1 protein」

小林 駿介、深津 理乃、加納 豊、正井 久雄

(11) The 10th International 3R Symposium(国際学会)(2016 年)

「Novel higher-order DNA structures containing G-quadruplex structures on both strands of Rif1 binding region play a crucial role in determination of replication timing domain」

Hisao Masai, Yutaka Kanoh, Naoko Kakusho, Rino Fukatsu, Yue Ma, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Seiji Matsumoto.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト

<http://www.igakuken.or.jp/genome/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。